

平成 21 年 5 月 12 日現在

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2007 年度～2008 年度

課題番号：19370053

研究課題名（和文） 多細胞動物の成立におけるチロシンキナーゼの役割に関する研究

研究課題名（英文） Roles of tyrosine kinases during evolution of multicellular animals

研究代表者

岡田 雅人（OKADA MASATO）

大阪大学・微生物病研究所・教授

研究者番号 10177058

研究成果の概要：

蛋白質のチロシン残基特異的リン酸化酵素（チロシンキナーゼ）は動物特有の酵素である。本研究では、多細胞動物の成立におけるチロシンキナーゼの意義を明らかにするために、動物の祖先とされる単細胞原生物（立襟鞭毛虫）、原始的な多細胞動物（海綿）、および、特殊に進化した線形動物（線虫）をモデルとして用いた解析を行い、チロシンキナーゼおよびその下流因子の活性制御系が動物の多細胞化の過程で発達あるいは特殊化してきたことを明らかにした。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	8,200,000	2,460,000	10,660,000
2008 年度	6,000,000	1,800,000	7,800,000
年度			
年度			
年度			
総計	14,200,000	4,260,000	18,460,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・機能生物化学

キーワード：多細胞動物、進化、チロシンキナーゼ、リン酸化、Src、Csk、立襟鞭毛虫、線虫

1. 研究開始当初の背景

蛋白質のリン酸化は、生命活動の基本となる物質代謝や細胞内情報伝達の調節を司る必須の生化学反応である。特異的な蛋白質リン酸化酵素（プロテインキナーゼ）が、Ser、Thr、Tyr、His 残基などに主に ATP からリン酸基を転移する反応を触媒し、リン酸化された蛋白質はコンフォメーションや他の分子との相互作用を変化させることによって新たな生理活性や機能を発現する。プロテインキナーゼは、ウイルスやファ-

ジの類いを除くあらゆる生物に存在するが、生物種によってリン酸化するアミノ酸残基に特徴がある。Ser、Thr 残基のリン酸化は生物全般に認められるのに対して、His 残基のリン酸化は原核生物、酵母、植物に限られ、Tyr 残基のリン酸化は動物にのみ存在するとされている。このようなリン酸アミノ酸の使い分けと生物の特性とに密接な関係があることが推察され、生物種特有の生命活動の本質を理解するためにも、蛋白質のリン酸化反応による機能調節機構を

理解することはきわめて重要と思われる。

Tyr 残基に特異的なチロシンキナーゼ活性は、がん遺伝子 *v-src* の蛋白質産物 *v-Src* に初めて同定され、その後、正常細胞内のがん原遺伝子産物や様々な増殖因子受容体にもその活性が見出されてきた。またごく最近まで、チロシンキナーゼは多細胞動物に特異的に存在するとされ、その特徴である「細胞膜を介する高速の細胞間情報伝達」を担うことから多細胞動物の成立に必須の要素であると考えられてきた。申請者らは、がん遺伝子由来の代表的なチロシンキナーゼである *Src* 型チロシンキナーゼに焦点をあてて、その高等動物における機能および制御機構に関する研究を十数年来続けている。これまでに、*Src* が別種のチロシンキナーゼ *Csk* を介するリン酸化によって負の活性制御を受けること (Nada et al. *Nature*, 1991)、*Src* が *Csk* の制御下で哺乳動物の中樞神経系の発達 (Nada et al. *Cell*, 1993)、免疫系細胞の活性化、細胞の接着や運動性 (Rengifo-Cam et al. *Oncogene*, 2004) などで必須の役割を担っていることを明らかにしてきた。しかしながら、これまでに報告されている *Src* の機能がきわめて多様であること、特に哺乳動物では8種類の *Src* のファミリーメンバーが存在することや機能的に相互作用する情報受容分子も実に多彩であることなどから、その本質的な存在意義や、異常活性化に伴うがん化および悪性化のメカニズムはいまだに決定的ではない。こうした状況をブレークして多細胞動物における *Src* の機能の本質を理解するためには、進化を遡って原始的かつ単純な生物種での機能解析をする必要があるという考えに至り、昨年度までの研究で、最も原始的な多細胞動物「海綿」と最も動物に近い原生生物「立襟鞭毛虫」における *Src* の機能と制御機構の解析を進めてきた (図1、Segawa et al. *PNAS*, 2006)。

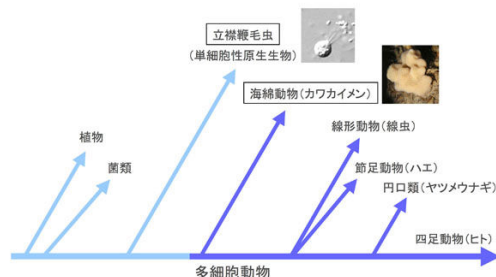


図1. 動物の進化

その結果、*Src* とその制御因子 *Csk* が海綿

のみならず立襟鞭毛虫にも存在することが明らかとなり、*Src* の機能および制御系が単細胞原生生物の段階で既に成立していた可能性がまず示された。しかしながら、それら原始的な *Src* の活性を解析した結果、海綿の *Src* が哺乳動物の *Src* と同様に *Csk* によって厳密な活性抑制を受けるのに対して、立襟鞭毛虫の *Src* は活性抑制が不十分で常に活性状態にある事が見いだされた。また、活性制御の有無が活性ドメインの高次構造変化によることも示唆された。これらのことから、*Src* の活性制御系が、単細胞から多細胞動物への進化に伴って獲得されてきたものであるという仮説が提唱されている。

哺乳動物で *Csk* をノックアウトすることによって *Src* を脱制御すると、上皮系細胞の細胞間相互作用が破綻し、炎症の発症を伴って異常な増殖や細胞の浸潤がみられることや (Yagi et al. *EMBO J*, 2007)、*Csk* によってリン酸化されない恒常活性型の *Src* を細胞に発現させると細胞形質が変化し接着や運動性に異常が生じること (Kotani et al. *Neurosci. Res*, 2006) などから、多細胞動物ではその正常な個体発生や維持に *Csk* を介する *Src* の活性制御系が必須であることが明らかになっている。こうした事実からも、多細胞性の獲得と *Src* の活性およびその制御系の成立とに密接な関係があることが示唆されている。しかしながら、実際の海綿や立襟鞭毛虫における *Src* の機能やその下流経路の解析が次の課題として残されたままとなっている。

2. 研究の目的

本研究では、動物におけるチロシンキナーゼの最も基本的な存在意義を明らかにすることを最終目標として、立襟鞭毛虫および線虫を研究対象として動物進化に伴う *Src* シグナル系の機能変化の意義を明らかにするために以下の解析を行う。

(1) 立襟鞭毛虫を用いた解析

①立襟鞭毛虫へ遺伝子導入法を確立し、*Src* の単細胞動物における生理的機能を解析する。

立襟鞭毛虫では遺伝子導入法もまだ確立していないため、まず、モデル生物系として利用可能か否か試みる。遺伝子導入が可能となれば、種々のcDNAあるいはRNAiを導入して、*Src* の生理機能を検討する。

②動物の多細胞化にともなって機能変化する

る他のシグナル分子の同定とそのSrcとの関連性の解析

Srcと同様に、立襟鞭毛虫と海綿など多細胞動物の間で大きな機能変化のあるシグナル分子を、立襟鞭毛虫のcDNAライブラリーより探索する。同定された分子とSrcシグナル伝達系との関連性を検討する。

(2) 線虫を用いた解析

線虫では、SrcファミリーとしてSRC-1とSRC-2の二種類と、その制御因子としてCSK-1が一種類存在する (Hirose et al. FEBS lett, 2003)。その後の解析によってSRC-2は必須ではないことが明らかとなり、線虫では実質的にSRC-1とCSK-1の一对のペアで充分機能的であることが示されている。従って、Srcの機能解析に関しては線虫がより単純な系と考えられ、また、洗練された遺伝学的な手法が確立している点などから、線虫を用いた解析を進めることにした。

申請者らはこれまでに、SRC-1変異体を用いた解析から、SRC-1が卵巣の形態形成を担うDistal Tip cell (DTC) の移動や、神経細胞 (Q cell由来) の移動や軸索伸長の極性決定において必須の役割を担うことを明らかにした (Itoh et al. Development, 2005)。また、CSK-1変異体を用いた解析からは、SRCの活性がアクトミオシン系などの細胞内骨格系の配向、極性の制御に必須であることを見出している。これらの結果から、SRC-1が細胞極性を制御するシグナル伝達系で重要な役割を担うことが示唆されている。しかしながら、その細胞内シグナル伝達経路、特にSRC-1の直接的なターゲット蛋白質は不明のままである。また、SRC-1がCSK-1によって制御されているか否かも未解決の課題として残されている。

そこで本研究では、線虫を用いた以下の解析を行う。

① SRC-1 と相互作用する分子を Yeast two-hybrid screening (Y2H) 法により同定し機能解析を行う。また、それらの高等動物オルソログの機能解析を行う。

② CSK-1変異体の解析をさらに進め、SRC-1とCSK-1との関連性を明らかにする。

③ SRC-1 変異体および CSK-1 変異体の suppressor変異体あるいは関連した表現型を示す変異体を分離し、その原因遺伝子を同定する。

以上のモデル生物系を対象とした研究か

ら Src 本来の機能が明確になることによって、多細胞動物成立の基本原理の理解を深めることが出来ると思われる。一方、ある種のヒトがんでは Src の活性上昇によって浸潤転移能が亢進することや、血管新生や骨代謝の異常にも Src が関与することが古くから知られている。本研究によって Src の機能の本質が明らかとなれば、このようなヒトの疾患に対する処方策を開発するための新たな基礎情報が得られることも期待される。

3. 研究の方法

(1) 立襟鞭毛虫を用いた解析

①立襟鞭毛虫へ遺伝子導入法を確立し、Srcの単細胞動物における生理的機能を解析する。

立襟鞭毛虫 (*M. ovata*) の実験室での効率的な培養方法を再検討し、cDNAの強制発現系やRNAiによる遺伝子発現のノックダウン法を試みる。リポフェクション法、エレクトロポレーション法、餌となるバクテリアへの遺伝子導入、バキュロあるいはレトロウイルスの感染などあらゆる方法を検討する。導入法が確立できた場合には、立襟鞭毛虫の増殖、分化、行動や群体形成におけるSrcの生理的意義を検討する。また、既存のSrc阻害の中で、PP2が立襟鞭毛虫のSrcに有効であることが明らかとなっているので、PP2を用いてSrcの活性の意義を検討する。

②動物の多細胞化にともなって機能変化する他のシグナル分子の同定とそのSrcとの関連性を解析する。

Srcと同様に、立襟鞭毛虫と海綿など多細胞動物の間で大きな機能変化のあるシグナル分子を、立襟鞭毛虫のcDNAライブラリーより探索する。同定された分子とSrcシグナル系との関連性を検討する。また、高等動物の関連分子を同定し、その機能解析を動物細胞系で行なう。

(2) 線虫を用いた解析

① SRC-1 と相互作用する分子を Yeast two-hybrid system (Y2H) により同定し機能解析を行う。また、それらの高等動物オルソログの機能解析を行う。

まず、SRC-1と直接相互作用する分子の同定を試みる。野生型SRC-1、恒常活性型変異体SRC-1YFおよび不活性型変異体SRC-1KMをbaitにしたY2Hによって線虫ライブラリーをscreeningする。陽性クローンが得られた場

合には、酵母細胞などの発現系を用いて、SRC-1との相互作用がリン酸化依存的か否かの決定、結合部位の同定などを行い、結合様式を明らかにする。特に、SRC-1の基質となる分子に注目して解析を進める。Y2Hによって同定された分子の変異体が既に存在する場合には、SRC-1との関連性を遺伝学的に解析する。SRC-1との二重変異体の表現型を解析することにより、シグナル伝達経路上の位置関係を検討する。CSK-1についても同様な手法で、相互作用する分子を同定し、その機能を明らかにする。

②CSK-1変異体の解析を電子顕微鏡などを用いてさらに進める。また、CSK-1変異体におけるSRC-1の活性を生化学的手法および免疫組織化学的手法により解析し、CSK-1がSRC-1の制御因子として機能しているか否か検討する。

③ SRC-1 変異体およびCSK-1 変異体の suppressor 変異体あるいは関連した表現型を示す変異体を分離し、その原因遺伝子を同定する。線虫を変異原物質で処理し、AVM神経細胞の移動がSRC-1変異体と同様に变化する変異体を単離する。原因遺伝子の同定は、SNPを指標にした交雑によるマッピング法、フォスミドレスキュー法、塩基配列決定法を組み合わせで行う。

4. 研究成果

(1) 立襟鞭毛虫を用いた解析

①立襟鞭毛虫におけるSrcの生理的機能解析に向けて

現時点で考えられるあらゆる遺伝子導入法を試みたが、Srcなどの遺伝子発現を誘導させることが出来なかった。また、RNAi法による遺伝子ノックダウンも同様な手法で試みたが、有意な影響を観察することは出来なかった。したがって、立襟鞭毛虫での遺伝子操作による機能解析は継続課題として残された。

しかしながら、蛍光ビーズなどを活発に取り込み、特定の細胞内オルガネラ(リソソーム)に蓄積することが観察されたことなどから、立襟鞭毛虫がきわめて活発な食作用を示すことが明らかとなった。現在、この食作用を利用して、ポリエチレンジアミンを用いた新たな導入法を試みようとしている。

ごく最近、立襟鞭毛虫の前ゲノムが解読された。今後は、その情報を利用して、変異体を作製するなどの新たなアプローチにより

遺伝子機能の解明を進めたいと考えている。

②動物の多細胞化にともなって機能変化する他のシグナル分子の同定

これまでの解析により、立襟鞭毛虫のSrcは活性制御系が未発達のため、正常型でも多細胞動物の細胞をトランスフォームできることが明らかになっている。そこで、立襟鞭毛虫のcDNAライブラリーを作製し、動物細胞(3Y1細胞)のトランスフォーメーション活性を指標にして、Srcと同様に活性制御系に変化のある分子の探索を行った。その結果、やはりSrcが主要な分子として同定されてきたが、それに加えてSrcシグナルの下流に位置するPAKキナーゼが同定された。海綿やヒトのPAKには、トランスフォーメーション活性がないことから、PAKにおいても多細胞化の段階で制御系に大きな変化があることが示唆された。そこで、その変化を細胞および分子レベルで解析したところ、立襟鞭毛虫PAKでは、制御ドメイン(PBD)を介する活性抑制系が未発達で、制御因子(Rac)との結合能が高く、また結合のない状態でも十分な活性を発揮することが見いだされた。また、海綿PAKではその制御系がほぼ完成していて活性のオン-オフがシャープなこと、ヒトPAKに至っては活性のオン-オフの振幅がさらに大きくなっていることも明らかとなった。これらの結果より、PAKにおいても活性制御系が多細胞動物の進化の過程で発達してきたことが示された(図2、渡利ら、癌学会、2008)(論文準備中)。

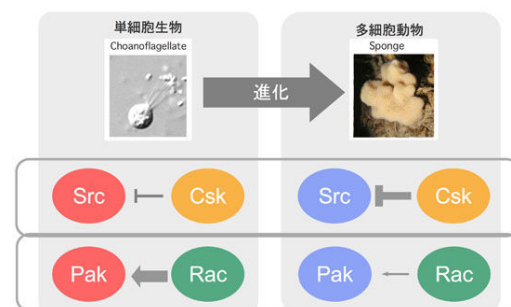


図2. 動物進化におけるシグナル分子の制御機構の変化

(2) 線虫を用いた解析

①SRC-1と相互作用する分子の同定

線虫SRC-1とリン酸化依存的に結合する分子として、Wntシグナル関連分子を複数同定した。その中で特に強い相互作用を示すPRKL-1について機能解析を進めた。PRKL-1を欠損する変異体を単離し、SRC-1との関連性を遺伝学的に調べた結果、PRKL-1とSRC-1

の二重変異体では、初期発生の段階（EMS細胞）での筋肉（MS細胞）と腸（E細胞）への運命決定に欠陥が生じることが観察された。このことから、PRKL-1はWntシグナル系と連携して、SRC-1と協調的に機能していることが明らかとなった（図3、Itoh, et al. Worm meeting, 2008）（論文準備中）。また、マウスのPrickle-1およびPrickle-2をクローニングし、マウスSrcとの関連性を解析した結果、線虫同様にSrcによるPrickle-1/2のリン酸化が認められた（高橋ら、分子生物学会、2008）。

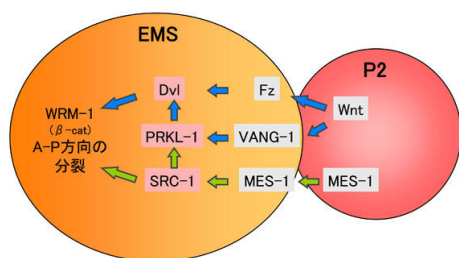


図3. 細胞運命決定における PRKL-1 と SRC-1 の機能

②SRC-1とCSK-1との関連性

SRC-1の制御因子として考えられるCSK-1の変異体の解析を進めた。その表現型およびSRC-1の活性に対するCSK-1の意義を詳細に検討した結果、線虫では、CSK-1がSRC-1の活性制御にかならずしも必須ではないこと、また、CSK-1がSRC-1とは独立して特に咽頭筋の構築において必須の役割を担うことが明らかとなった（図4）。この結果より、CskによるSrcの制御系が動物進化の過程で多様化していること、CSK-1にSRC以外の基質が存在する可能性が示唆された（Takata, et al, Genes Cells, 2009）。

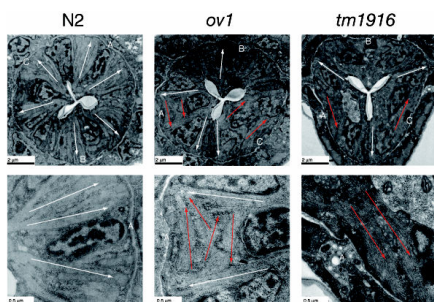


図4. CSK-1変異体 (ov1とtm1916) における咽頭筋線維の異常

そこで次に、CSK-1の基質を同定する目的で、CSK-1と相互作用する分子をY2Hにより同定を試みた。その結果、筋繊維の構築の制御に係わるLIM-8が、CSK-1によってリン酸

化されること、およびそのリン酸化依存的にCSK-1と結合することが見いだされた。このことより、CSK-1が筋線維の制御因子を直接リン酸化することにより筋繊維の構築に係わる可能性が示された（高田ら、分子生物学会、2008）。

③SRC-1変異体と関連した表現型を示す変異体の単離

SRC-1変異体では、神経細胞（Q細胞由来のAVM細胞）の前方方向への移動に異常が認められる（図5）。その異常と関連する表現型を示す変異体の単離を試み、膜タンパク質MIG-13の変異体を単離した。また、MIG-13変異体の suppressor 変異体を単離し、それを用いた遺伝学的な解析より、SRC-1がMIG13と同じ経路で神経細胞の位置情報の決定に重要な役割を担うことを明らかにした（増田ら、分子生物学会、2008）。

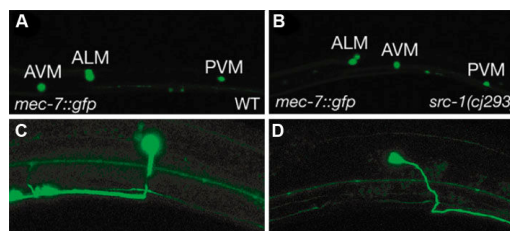


図5. SRC-1変異体 (BとD) における神経細胞の位置異常

(3) 総括

以上の解析により、動物の多細胞化ともなっており、SrcやPAKなどの主要なシグナル分子の制御系が発達してきたことが確認された。しかしながら、線虫など独特の進化の道を辿った動物では、その制御系をさらに特殊化していることも明らかとなってきた。これらのことは、動物の多様性が、新たな遺伝子やタンパク分子などのハードウェアの獲得だけではなく、それらの機能や制御機構などのソフトウェアの変化によることを改めて示している。主要なシグナル分子の機能や制御系の破綻が動物の多細胞性を破綻させ、がん化とも密接に関連することから、本研究による基礎的な解析結果が、がんなどヒト疾患発症のメカニズムの理解にも繋がることが期待される。

5. 主な発表論文等

（研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線）

〔雑誌論文〕（計4件）

Takata, N., Itoh, B., Misaki, K., Hirose, T., Yonemura, S., & Okada, M. Non-receptor tyrosine kinase CSK-1 controls pharyngeal muscle organization in *Caenorhabditis elegans*. *Genes Cells*. 14, 381-393 (2009)

Takatsuka, A., Yaga, R., Koike, M., Oneyama, C., Nada, S., Schmedt, C., Uchiyama, Y. & Okada, M. Ablation of Csk in neural crest lineages causes corneal anomaly by deregulating collagen fibril organization and cell motility. *Dev Biol*. 315, 474-488 (2008).

Oneyama, C., Hikita, T., Nada, S. & Okada, M. Functional dissection of transformation by c-Src and v-Src. *Genes to Cells* 13, 1-12 (2008)

Yagi, R., Waguri, S., Sumikawa, Y., Nada, S., Oneyama, C., Itami, S., Schmedt, C., Uchiyama, Y. & Okada, M. C-terminal Src kinase controls development and maintenance of mouse squamous epithelia. *Embo J* 26, 1234-1244 (2007).

[学会発表] (計 7 件)

Itoh, B. et al. SRC-1 interacts with Wnt signaling protein PRKL-1/Prickle in *C. elegans*. 2008 East Asia Worm Meeting, 20 April 2008, Shanghai, China

Takata, N. et al. CSK-1 controls pharyngeal muscle organization in *C. elegans*. 2008 East Asia Worm Meeting, 19 April 2008, Shanghai, China

高橋佑介、哺乳動物においてSrcシグナルに関与するWntシグナル分子 Prickleの機能解析、第31回日本分子生物学会年会・第81回日本生化学会大会合同大会、2008年12月11日、神戸ポートアイランド

渡利彰浩、Functional transition of proto-oncogenes during evolution of multicellularity in animals. 第67回日本癌学会学術総会、2008年10月28日、名古屋国際会議場

伊東文祥、線虫SRC-1はWntシグナルに関与する、第30回日本分子生物学会年会・第80回日本生化学会大会合同大会、2007年12月14日、パシフィコ横浜

高田望、線虫の非受容体型チロシンキナーゼ Srcの負の制御因子であるCSK-1は咽頭筋原繊維の構築を制御する、第30回日本分子生物学会年会・第80回日本生化学会大会合同大会、2007

年12月13日、パシフィコ横浜

増田瞳、線虫*C.elegans*におけるmechanosensory neuronの極性決定に関わる遺伝子群のスクリーニング、第30回日本分子生物学会年会・第80回日本生化学会大会合同大会、2007年12月12日、パシフィコ横浜

[その他]

6. 研究組織

(1) 研究代表者

岡田 雅人
大阪大学・微生物病研究所・教授
研究者番号 10177058

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者